



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|---|--|--|---|
| (51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/685, A61K 47/48 | | A2 | (11) Numéro de publication internationale: WO 96/41815 (43) Date de publication internationale: 27 décembre 1996 (27.12.96) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00890 (22) Date de dépôt international: 12 juin 1996 (12.06.96) | | (81) Etats désignés: AU, CA, IL, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). | |
| (30) Données relatives à la priorité: 95/06909 12 juin 1995 (12.06.95) FR | | Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> | |
| (71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT EUROPEEN DE BIOLOGIE CELLULAIRE [FR/FR]; 18, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). | | | |
| (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): DUSSOURD D'HINTERLAND, Lucien [FR/FR]; 10, rue Pierre-Benoit, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; 771, rue des Navigateurs, La Grande-Motte, F-34280 La Grande-Motte (FR). | | | |
| (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Reginbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). | | | |
| (54) Title: CONJUGATES OF α MSH WITH A FATTY ACID, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF AS A DRUG | | | |
| (54) Titre: CONJUGUES D' α MSH AVEC UN ACIDE GRAS, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT | | | |
| (57) Abstract | | | |
| <p>A peptide conjugate comprising a peptide sequence that includes at least one sequence of four αMSH-derived amino acids optionally in a natural form, said sequence being chemically or physically conjugated with acids selected from either dicarboxylic acids of general formula (I): HOOC-R1-COOH, wherein R1 is a straight or branched alkylene radical having at least 3 and preferably 3-10 carbon atoms, and being optionally substituted, in particular by one or more amino or hydroxy groups; or α-monounsaturated fatty acids with a cis or preferably trans configuration, of general formula (II): R2-CH=CH-COOH, wherein R2 is a straight or branched alkyl radical having at least 6 and preferably 6-10 carbon atoms, and being substituted by an amino, hydroxy or oxo group.</p> | | | |
| (57) Abrégé | | | |
| <p>L'invention concerne un conjugué peptidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l'αMSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides sélectionnés parmi: les acides di-carboxyliques de formule générale (I): HOOC-R1-COOH, dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et les acides gras α-monoinsaturés de configuration cis ou trans, de préférence trans, de formule générale (II): R2-CH=CH-COOH, dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.</p> | | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|---------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Arménie | GB | Royaume-Uni | MW | Malawi |
| AT | Autriche | GE | Géorgie | MX | Mexique |
| AU | Australie | GN | Guinée | NE | Niger |
| BB | Barbade | GR | Grèce | NL | Pays-Bas |
| BE | Belgique | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BF | Burkina Faso | IE | Irlande | NZ | Nouvelle-Zélande |
| BG | Bulgarie | IT | Italie | PL | Pologne |
| BJ | Bénin | JP | Japon | PT | Portugal |
| BR | Brésil | KE | Kenya | RO | Roumanie |
| BY | Bélarus | KG | Kirghizstan | RU | Fédération de Russie |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan |
| CF | République centrafricaine | KR | République de Corée | SE | Suède |
| CG | Congo | KZ | Kazakhstan | SG | Singapour |
| CH | Suisse | LI | Liechtenstein | SI | Slovénie |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SK | Slovaquie |
| CM | Cameroun | LR | Libéria | SN | Sénégal |
| CN | Chine | LT | Lithuanie | SZ | Swaziland |
| CS | Tchécoslovaquie | LU | Luxembourg | TD | Tchad |
| CZ | République tchèque | LV | Lettonie | TG | Togo |
| DE | Allemagne | MC | Monaco | TJ | Tadjikistan |
| DK | Danemark | MD | République de Moldova | TT | Trinité-et-Tobago |
| EE | Estonie | MG | Madagascar | UA | Ukraine |
| ES | Espagne | ML | Mali | UG | Ouganda |
| FI | Finlande | MN | Mongolie | US | Etats-Unis d'Amérique |
| FR | France | MR | Mauritanie | UZ | Ouzbékistan |
| GA | Gabon | | | VN | Viet Nam |

*CONJUGUES D'αMSH AVEC UN ACIDE GRAS, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET
LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT*

La présente invention a pour objet la réalisation de dérivés peptidiques homologues de l'αMSH ou Mélanotropine, obtenus par synthèse 5 chimique, présentés sous forme de lipo-peptides.

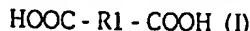
L'αMSH et ses homologues ont fait l'objet de nombreuses publications, voire même d'essais thérapeutiques sans que cela se traduise par la réalisation d'un médicament. La raison principale est l'extrême ubiquité de l'αMSH en fonction des doses administrées et des voies d'administration.

10 De plus, l'absence de relation doses / effets (ce qui est le cas de nombreuses hormones peptidiques) complique sérieusement son utilisation thérapeutique. En effet, les récepteurs cellulaires de l'αMSH et de ses homologues sont du type G et la transduction intra-cellulaire s'effectue selon 15 le cycle de l'AMP cyclique, l'activation de ces récepteurs cellulaires est sensiblement inversement proportionnelle aux doses d'hormones peptidiques, acceptées par les structures du récepteur membranaire.

La présente invention repose sur la recherche de structures peptidiques spécifiquement orientées vers les activités anti-allergiques et anti-inflammatoires d'une part, et activatrices de la mélanogénèse d'autre 20 part à l'exclusion de tout autre effet pharmacologique notamment au niveau du système nerveux central, comme du système nerveux périphérique.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un conjugué comportant une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l'αMSH, les acides aminés étant sous 25 forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides notamment dérivés d'acides à activités métaboliques connues, sélectionnés parmi :

- les acides dicarboxyliques de formule générale I



30 dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone de préférence ayant de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et

- les acides gras α-monoinsaturés de formule générale II



dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone éventuellement substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo, ces acides ayant la configuration cis ou trans, de préférence trans.

5 La séquence de l'αMSH est la suivante :

N-acétyl-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phé-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

Dans ce qui suit, lorsque l'on mentionne les séquences provenant de l'αMSH il faut entendre que les acides aminés peuvent être sous forme D, L, ou D,L ou bien sous les formes non naturelles des acides aminés correspondant à des dérivés, notamment substitués, halogénés par exemple.

10 Les peptides conjugués de bas poids moléculaire selon l'invention sont avantageusement liés sous forme de sels, d'esters ou d'amides, à des acides possédant des fonctions métaboliques essentielles dans l'activation du cycle tricarboxylique cellulaire tels qu'ils sont décrits précédemment.

15 Les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi les diacides carboxyliques pour lesquels R1 représente un reste alkylène en C₄-C₈, substitué ou non, en particulier les acides adipiques, α-amino-adipiques et dérivés, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α-monoinsaturés pour lesquels R2 représente un reste alkyle, linéaire ou 20 ramifié en C₇, en particulier les acides hydroxydécenoïques, et décenoïques, sous forme des sels, esters, ou amides correspondants.

Il s'agit de préférence de l'acide adipique ou "acide hexanedioïque" (ADIP), de l'acide α-amino adipique (2-amino hexanedioïque), de l'acide sébacique ou acide décanedioïque, de l'acide trans - 10 - hydroxy - Δ² - 25 décenoïque ou acide trans-hydroxy - 10 - décène - 2 - oïque (AH), et de l'acide trans-oxo - 9 - décène - 2 - oïque (9 - ADO).

Parmi ces acides, figurent préférentiellement pour des applications en phase soluble dans l'eau, les acides adipiques et amino-adipiques.

30 Parmi les acides figurent les acides gras suivants plus particulièrement adaptés pour l'obtention de dérivés peptidiques liposolubles, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide oxo-décéné-oïque, et l'acide trans-hydroxy-décenoïque, définis précédemment, et dont les activités biologiques sont liées à leurs propriétés, anti-androgène, anti-séborrhéique et lipolytiques (Madéa et coll., Nippon, Hifuka - 98 (4) p. 469 - 1988).

Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides activateurs de la mélanogénèse, anti-allergique et anti-inflammatoire.

La séquence de 4 acides aminés provenant de l' α MSH, des conjugués selon l'invention, comprend de préférence au moins l'une des séquences peptidiques suivantes :

- Glu - His - Phé -
- His - Phé - Arg -
- Glu - His - Phé - Arg -

10 dans laquelle Phé représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine, notamment D-homo-Phé et parafluoro-Phé les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou D,L

D'une manière avantageuse, les conjugués selon l'invention répondent à la formule générale III :



15 dans laquelle

A est un acide de formules générales I ou II telles que définies ci-dessus, en particulier l'acide adipique, ou l'acide α -amino adipique, l'acide sébacique, l'acide trans-oxo-9-décéne-2-oïque ou l'acide trans-hydroxy-10-décéne-2-oïque,

20 X représente un groupe 5-Me.Norleucine (Me.Nle), 2-N-Me-Norceuline (N-Me.Nle), OH ou NH₂,

Y représente un reste Arg - Z ou Z dans lequel Z est Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH₂, Trp - NH₂, ou NH₂,

25 Phé représente un reste D-Homo-Phé ou para-fluoro-Phé, les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L

La présente invention concerne particulièrement les dérivés peptidiques suivants :

- 1 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂
- 2 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH₂
- 30 3 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH₂
- 4 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH₂
- 5 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂
- 6 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - NH₂
- 7 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - NH₂

8 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - NH₂
 9 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂
 10 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH₂
 11 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH₂
 12 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH₂
 5 13 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 14 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH
 15 A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - OH
 16 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 17 A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH
 10 18 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 19 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
 20 A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - OH
 21 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
 22 A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
 15 A étant défini ci-dessus, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

Dans les conjugués 1 à 22 ci-dessus, la position de l'acide A correspond au dérivé ester ou amide, la fraction acide carboxylique de l'acide assurant la liaison.

20 Les séquences d'amino-acides mentionnées précédemment peuvent être des séquences d'amino-acides naturels ou des séquences d'amino-acides non naturels. De même dans certains cas il est possible que certains de ces amino-acides comportent des fonctions par exemple des glycosylations. Il doit être entendu que la présente invention concerne également l'ensemble de 25 ces formes comprises par la présente description.

La présente invention concerne également des médicaments contenant un ou plusieurs des conjugués selon l'invention.

La présente invention concerne également l'utilisation de ces composés dans le domaine de la cosmétique.

30 La présente invention concerne également des compositions galéniques, pharmaceutiques, dermo-cosmétiques ou cosmétiques comprenant un composé tel que défini précédemment.

35 Ces compositions peuvent se présenter sous l'une des formes connues dans les domaines cosmétiques bien que les formes topique et parentérale soient préférées.

Ces compositions sont utilisables aussi bien dans le domaine humain que vétérinaire.

Un des objets de la présente invention est l'application par voie topique et parentérale des conjugués peptidiques précédents. Les compositions pharmaceutiques peuvent être sous forme administrable par voie orale ou parentérale, injectable notamment, mais de préférence sous forme administrable par voie topique externe.

Ces compositions peuvent être notamment, sous forme de crème, spray, ou lotion par exemple et comporter des excipients connus et éventuellement d'autres principes actifs. Avantageusement, il s'agit de préparations dermo-cosmétologiques sous forme de solutions, de lotions d'émulsions, ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau, sans exposition aux U.V.

Les composés selon la présente invention sont utiles notamment dans la prévention et le traitement des allergies notamment cutanées, des réactions inflammatoires, et des troubles de mélanogénèse.

Les conjugués dont la séquence peptidique possède en position 4 l'amino-acide para-fluoro-Phé (dérivés peptidiques 5 à 8 et 18 à 22), sont particulièrement orientés vers une activité biologique anti-allergique et anti-inflammatoire, par effet suppresseur sur les médiateurs de l'inflammation et de l'allergie (IL1, IL6, α TNF, PGE₂), à l'exclusion d'une action sur la mélanogénèse.

Les conjugués dont les séquences en position 4 possèdent l'amino-acide D-homo-Phé (dérivés peptidiques 1 à 4 et 9 à 17), sont particulièrement orientés vers des activités de stimulation des processus de mélanogénèse, et possèdent également une activité anti-allergique et anti-inflammatoire.

Les séquences peptidiques selon la présente invention peuvent être obtenues par l'un des procédés quelconque connus de l'homme de métier, notamment par des procédés de synthèse chimique dans laquelle on peut intégrer les différents acides. En tout état de cause compte tenu de la faible dimension des peptides, la synthèse chimique est tout à fait possible et permet d'obtenir des produits très purs.

D'autres caractéristiques des conjugués selon l'invention apparaîtront à la lumière des exemples ci-après, qui illustrent également leur procédé de préparation par synthèse chimique.

Exemple 1 : Synthèse du conjugué 1 - A = Acide Adipique

Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂.

La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield en phase solide en utilisant une résine MBHA, et comme groupement protecteur FMOC (fluoroényl méthoxy carbonyl).

Les dérivés d'acides aminés utilisés sont les suivants :

- FMOC - Gly - OH,
- FMOC - Trp - OH,
- FMOC - Arg (Tos) - OH,
- FMOC - D-homo-Phé - OH,
- FMOC - His (Trt) - OH,
- FMOC - Glu (chex) - OH, et
- FMOC - Me.Nle - OH,

que l'on couple en utilisant le BOP comme agent de couplage.

Chaque acide aminé est utilisé en excès (x2) ainsi que le BOP (x2) et chaque couplage est répété 2 fois.

L'acide adipique est couplé de façon similaire, le groupement FMOC étant éliminé à chaque étape par la pipéridine (20 % dans le diméthylformamide). La déprotection finale est effectuée en deux étapes :

- 20 a) acide trifluoroacétique (2 fois x 5 minutes)
- b) acide fluorhydrique anhydre / p-crésol 95,5 (45 minutes).

Le composé brut obtenu avec un rendement de 78 % est repris dans un mélange eau/acide acétique 95,5 % et est ensuite lyophylisé.

Le composé P1 obtenu a une pureté de 82 % (HPLC). 100 mg de ce composé sont ensuite purifiés par HPLC en utilisant une colonne C18 et on obtient 65 mg de produit pur.

Temps de rétention = 17,04 minutes dans les conditions suivantes :

- colonne C8 (250 mm x 5 mm), détection UV 210 nm
- solvant tampon phosphate Triéthylamine - acetonitrile 10 - 60 % en 15 minutes ; débit 1,4 ml / minute.

Analyse des acides aminés

Glu 1,02 - Gly 1,01 - His 1,00 - Arg 0,94 - D-homo-Phé 1,03 - (le Tryptophane n'a pas été déterminé car il se dégrade lors de l'hydrolyse acide).

Spectre de masse (FAB +) 1018,4 / 1126,5

Exemple 2 : Synthèse du conjugué 5 - A = Acide Adipique

En reprenant le mode opératoire de l'exemple 1 et en remplaçant FMOC-D-homo-Ph-OH par FMOC-para-fluoro-Phé-OH, on obtient le composé P2 :

5 Adipoyl - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂.

F = 120°C, décomposition. (α)_D - 7 (c = 0,4 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μm, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 30,45 min. ¹H RMN (DMSO-d₆) ppm : Me.Nle (4,76, 1,62, 1,24, 0,82) ; Glu (8,54, 4,32, 1,86-1,72, 2,24) ; His (8,09, 4,53, 2,95-2,82) ; Para-Fluoro-Phé (8,09, 4,53, 3,00-2,78, 7,3-7,0) ; Arg (8,36, 4,29, 1,54-1,68, 1,45, 3,07) ; Trp (8,07, 4,53, 3,16-3,01, 10,80, 7,19, 7,56, 7,30, 6,96) ; Gly (8,18, 3,67-3,54).

Exemple 3 : Synthèse du conjugué 1 - A - Acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque

En opérant comme dans l'exemple 1, en remplaçant l'acide adipique par l'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque, on obtient le composé P3 :

trans-10-hydroxy-2-décénoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂.

20 F = 115°C, décomposition. (α)_D - 16 (c = 0,3 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μm, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 71/29 v/v, temps de rétention 24,20 min. ¹H RMN (DMSO-d₈) ppm : Ac (1,84) ; Me.Nle (8,00, 4,15, 1,59-1,48, 1,23, 0,83) ; Glu (8,00, 4,15, 1,86-1,72, 2,19) ; His (8,00, 4,54, 3,00-2,88, 8,89, 7,26) ; D-Homo-Phé (7,98, 4,53, 2,99-2,78, 7,3-7,0) ; Arg (8,27, 4,29, 1,67-1,53, 1,46, 3,08) ; Trp (8,07, 4,54, 3,16-3,01, 10,80, 7,16, 7,56, 7,30, 7,04, 6,96) ; Gly (8,19, 3,68-3,54).

Exemple 4 : Synthèse du conjugué 2 - A = Acide α-Amino-Adipique

En opérant comme dans l'exemple 1, en remplaçant l'acide adipique par l'acide α-amino-adipique, on obtient le composé P4 :

α-amino-adipoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - Trp - NH₂.

F = 130°C, décomposition. (α)_D - 5 (c = 0,5 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μm, débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % /

acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 28,80 min. ^1H RMN (DMSO-d₆) ppm : Me.Nle (3,77, 1,62, 1,24, 0,82) ; Glu (8,53, 4,32, 1,82-1,71, 2,25) ; His (8,11, 4,53, 2,98-2,83) ; D-Homo-Phé (8,06, 4,47, 2,99-2,77, 7,25-7,1) ; Arg (8,32, 4,30, 1,69-1,55, 1,45, 3,07) ; Trp (8,02, 4,59, 3,16-3,00, 10,78, 7,15, 7,58, 7,30, 7,04, 6,96).

5

Exemple 5 : Synthèse du conjugué 3 - A = Acide Sébacique

En reprenant le mode opératoire de l'exemple 1, sans les réactifs FMOC - Gly - OH et FMOC - Trp - OH, en remplaçant l'acide adipique par l'acide sébacique, on obtient le composé P5 :

10 Sébaçoyle - Me.Nle - Glu - His - D-Homo-Phé - Arg - NH₂.

$F = 130^\circ\text{C}$, décomposition. (α)_D - 3,2 (c = 0,5 DMF). HPLC : colonne C₁₈, 5 μm , débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0,1 % / acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 21,86 min. ^1H RMN (DMSO-d₆) ppm : Me.Nle (4,70, 1,80, 2,30, 1,95) ; Glu (8,57, 4,30, 1,82-1,71, 2,25) ; His (8,21, 4,55, 2,98-2,83) ; Phé (8,09, 4,55, 2,99-2,77, 7,25-7,1) ; Arg (8,31, 4,30, 1,69-1,55, 1,45, 3,07) ; Trp (7,95, 4,61, 3,16-3,00, 10,78, 7,15, 7,58, 7,30, 7,04, 6,96) ; Gly (8,32, 3,75).

20 Exemple 6 : Etude de l'activité Anti-allergique des conjugués peptidiques, par le test d'Hypersensibilité de contact au Dinitro-fluorobenzène (DNFB).

Matériel et méthode

25 Des souris femelles C57 BL/6JICO, âgées de 5 semaines sont réparties en dix lots de dix animaux (cinq par cage), avec libre accès à l'eau et à la nourriture, soumises à une photopériode de douze heures de lumière par vingt-quatre heures.

30 Les animaux des lots 1 à 6 reçoivent quotidiennement et par application topique sur la peau rasée du dos, les produits à étudier (conjugués 1 et 5 représentés par les composés P1 et P2 préparés selon les exemples 1 et 2), mis en solution dans du propylène glycol, sous un volume constant de 50 μl et cela pendant cinq jours consécutifs.

Posologie par souris et par jour

35 Composé P1 - Lots 1, 2 et 3 - 2,5 μg , 0,5 μg et 0,1 μg /souris/jour respectivement.

Composé P2 - Lots 4, 5 et 6 - 2,5 µg, 0,5 µg et 0,1 µg /souris/jour respectivement.

Les animaux du lot 10 servent de témoins (ils reçoivent seulement, 50 µl de propylène glycol par application topique pendant cinq jours).

Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25 µl de D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot n° 33820890)) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf 0510) et de trioléine (FLUKA) appliqué par voie topique sur la région dorsale de peau rasée.

Au sixième jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D N F B.

Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 µl de D N F B à 0,8 %.

Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin.

Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le calcul suivant :

$$\frac{T - E}{T} \times 100$$

20 avec T pour le pourcentage d'augmentation de l'épaisseur moyenne des oreilles du lot témoin et E pour celui des lots qui ont reçu les produits à étudier.

25 Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU 1

| 5 | Conj. | Lot | % Augment. O. Gauche | % Augment. O. Droite | % Suppress. O. Gauche | % Suppress. O. Droite |
|----|-------|-----|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 17,50 | 17,80 | 69,80 | 69,57 |
| 1 | 2 | 2 | 19,00 | 19,50 | 67,24 | 66,66 |
| 10 | 1 | 3 | 21,50 | 22,00 | 62,93 | 62,39 |
| 10 | - | T | 58 | 58,50 | - | - |
| 15 | 5 | 4 | 17 | 16,65 | 70,48 | 71,39 |
| 5 | 5 | 5 | 18,60 | 19,00 | 67,70 | 67,35 |
| 5 | 5 | 6 | 20,80 | 21,50 | 63,88 | 63,05 |
| 15 | - | T | 57,60 | 58,20 | - | - |

T représente les Lots témoins pour chaque conjugué étudié.

Les conjugués 1 et 5 suppriment de façon hautement significative, de l'ordre de 69 % et 71 %, la réaction d'hypersensibilité cutanée induite par administration de D N F B dans les conditions expérimentales décrites précédemment.

Exemple 7 : Etude de l'activité anti-inflammatoire des conjugués 1 et 5 (composés P1 et P2)

25

But de l'étude :

Mise en évidence de l'effet inhibiteur des conjugués 1 et 5 (composés P1 et P2) sur la production par des fibroblastes stimulés par l'IL 1, d'un métabolite de l'acide arachidonique, la PGE2.

30 Méthodes :

1 - Culture de fibroblastes pulmonaires embryonnaires d'origine humaine :

Nous avons choisi d'utiliser la souche ATCC MRC5 entretenue au laboratoire de façon continue et déjà testée par Cannon et al. (J. Immunol., 1986). Après un repiquage, les fibroblastes sont cultivés dans des micropuits (plaqué de 24 trous de 2 cm², Falcon). L'innoculum est de 30 000 cellules par trou ; le milieu nutritif utilisé est composé de RPMI 1640 (90 %) et de sérum

de veau fœtal décomplémenté (SVF, 10 %). Le milieu est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules.

2 - Mise en expérience :

5 Les couches monocellulaires ainsi obtenues sont lavées puis préincubées pendant 24 heures dans du milieu frais ne contenant que 1 % de SVF. Les substances à tester sont ajoutées au milieu à différentes concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-4} M. Après 20 minutes d'incubation en présence de ces composés, l'IL1 recombinante humaine (Tebu, France) à la concentration de 5, 2,5 ou 0,5 ng/ml de milieu est mise en contact avec des 10 cellules pendant 18 heures. A la fin de cette incubation les surnageants sont prélevés et congelés à - 80 ° C jusqu'à l'analyse. Les couches monocellulaires sont fixées au méthanol.

10 3 - Dosage de PGE2 :

15 Le dosage RIA est effectué selon la méthode décrite par Dray et al. (Europ. J. Invest. 1975). 3 séries d'expériences en duplicate ont été réalisées pour chaque concentration de produit étudié et pour les contrôles. Les résultats sont exprimés en pg/µg d'ADN. L'effet inhibiteur est exprimé en pourcentage par rapport aux contrôles.

20 Afin d'éviter toute erreur possible due au comptage en microscopie optique, l'ADN a été dosé par méthode fluorimétrique selon le protocole décrit par Brunk et al. (Analytical Biochem., 1979).

Les tableaux 2 et 3 ci-après rassemblent une première série d'essais sur la souche MRCS.

TABLEAU 2
Action du Conjugué 1

| Concentration IL1 (ng) | Concentration Conjugué 1 (M) | PGE2 pg/mg d'ADN | % inhib. |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------|
| 2,5 | 0 | 389 ± 60 | - |
| | 10 ⁻⁴ | 179 ± 50 | 53 |
| | 10 ⁻⁵ | 232 ± 45 | 40 |
| | 10 ⁻⁶ | 292 ± 68 | 24 |
| | 10 ⁻⁷ | 364 ± 68 | 6 |
| | 10 ⁻⁸ | 335 ± 50 | 13 |
| | 10 ⁻⁹ | 320 ± 43 | 17 |
| 0,5 | 0 | 288 ± 25 | - |
| | 10 ⁻⁴ | 113 ± 25 | 60 |
| | 10 ⁻⁵ | 176 ± 37 | 38 |
| | 10 ⁻⁶ | 231 ± 55 | 19 |
| | 10 ⁻⁷ | 249 ± 60 | 13 |
| | 10 ⁻⁸ | 258 ± 35 | 10 |
| | 10 ⁻⁹ | 364 ± 56 | - |

Les résultats montrent une bonne action inhibitrice du conjugué 1 avec un rapport effet dose. Cette action ne dépend pas de la concentration en IL1. On n'observe pas d'action à partir de 10⁻⁷ M dans les deux cas.

TABLEAU 3
Action du Conjugué 5

| Concentration IL1 (ng) | Concentration Conjugué 5 (M) | PGE2 pg/mg d'ADN | % inhib. |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------|----------|
| 5 | 0 | 7576 ± 310 | - |
| | 10 ⁻⁴ | 2964 ± 184 | 60 |
| | 10 ⁻⁵ | 4580 ± 230 | 38 |
| | 10 ⁻⁶ | 4900 ± 340 | 34 |
| | 10 ⁻⁷ | 6150 ± 365 | 17 |
| | 10 ⁻⁸ | 6142 ± 255 | 17 |
| | 10 ⁻⁹ | 5047 ± 279 | 32 |

Les conjugués 1 et 5 possèdent un pouvoir inhibiteur de l'action de l'IL1 et de la PGE2. Très significative cette action pourrait être liée à un blocage des récepteurs.

Exemple 8 : Etude de l'action des conjugués 1 et 5 sur la mélanogénèse de la souris après l'application topique sous forme de crème dermique (Technique de Warren*)

Matériel et méthode

1) Matériel

- Excipient dermique N° 66

25 Lano - vaseline - Ac,

Huile de vaseline Pharmacopée,

Cire d'abeille Ethoxyle,

Lanoline purifiée,

PEG - 200.

30 - Formules dermiques

Conjugué 1 et 5 (représentés par les composés P1 et P2) incorporés à raison de 10×10^{-5} M dans l'excipient dermique N° 66.

- Animaux

Souris DBA/2 IFFA - CREDO agées de 5 semaines.

35 2) Méthodes (Raphael WARREN PhD & coll. 0022-202, 1987, Society for Investigate Dermatology).

- On délimite sur chaque animal une tonsure dorsale après épilation.
- Les produits à essayer sont appliqués par massage à raison de 2 applications par jour, de 50 µl de chaque préparation pendant 5 jours.
- 5 • Deux jours après la dernière application, on sacrifie les animaux et on prélève des fractions de 50 mg environ de peau traitée.
- Chaque prélèvement est désséché par lyophilisation et pesé.
- Les fragments de peau sont ensuite soumis à une hydrolyse enzymatique par la protéase K pendant 72 heures à 45°C (Protéase K Merck - 24.568).
- 10 • On ajoute aux hydrolysats obtenus 500 µl de Na₂CO₃ et 20 µl de H₂O₂ à 35 %.
- On met à incuber 30 minutes à 80°C.
- Après refroidissement on ajoute à chaque échantillon 200 µl de chloroforme / méthanol (2 vol/1 vol).
- 15 • On centrifuge à 10 000 g.
- On répartit la phase acqueuse (200 µl) dans les puits d'une microplaqué "NUNC".
- Dosage de la Mélanine
 - Le dosage de la mélanine s'effectue à 405 nm à l'aide d'un Multiskan - Titertek - MCC - 340, comparativement à une gamme étalon de mélanine Sigma M. 8631.
- Résultats

Ils sont exprimés en pourcentage de mélanine comparativement aux excipients considérés comme témoins.

 - 25 I - Crème 1 - 5 10⁻⁵ M de conjugué 1 pour 50 µl de crème.
 - II - Crème 5 - 5 10⁻⁵ M de conjugué 5 pour 50 µl de crème.
 - III - Excipient 66 - comme témoin T.

Les moyennes des résultats sur 15 dosages sont reportés sur le Tableau 4 ci-dessous.

30

TABLEAU 4

| Echantillon | % Mélanine / témoin |
|-------------|---------------------|
| I | 80 % |
| II | 12 % |
| 35 III | 5 % |

Le pourcentage de stimulation est calculé en fonction des valeurs QE et QT, avec QE pour la quantité moyenne de mélanine par mg de peau de l'échantillon testé et QT pour la quantité moyenne de mélanine par mg de peau du témoin, selon la formule

5

$$\% \text{ de stimulation} = \frac{QE - QT}{QT} \times 100$$

La crème dermique 1 administrée par voie topique, induit de façon hautement significative la synthèse de la Mélanine au niveau de l'épiderme 10 (+ 75 %). Cette activité conforme à l'objet de la présente invention est liée à la structure chimique du conjugué 1 qui contient le groupement D-homo-Phé.

Par contre, la crème dermique 5 administrée par voie topique, n'a pas d'activité sur la stimulation de la mélanogénèse épidermique, cette absence d'activité est liée à la présence dans le conjugué 5 du groupement 15 para-fluoro-Phé.

Ces résultats ont été confirmés par une étude sur la mélanogénèse selon la technique dite de "CLOUDMAN" par culture de mélanocytes in vitro, en utilisant les cellules du mélanome de CLOUDMAN chez le rat.

L'ensemble des résultats obtenus sont conformes à l'objet de la 20 présente invention dont l'objectif est la réalisation de conjugués actifs par voie topique et dont les activités anti allergiques et anti inflammatoires peuvent être séparées de l'activité sur la mélanogénèse selon les applications envisagées.

25 Exemple 9 : Etude comparative de l'activité des conjugués et de leurs structures peptidiques, sur l'hypersensibilité de contact au D N F B.

Matériel et méthode

30 La méthode utilisée est celle décrite précédemment dans l'exemple N° 4, hypersensibilité de contact induite chez la souris par la D N F B.

- Produits étudiés

Lot I : trans-10-hydroxy-2-décénoyl - Me-Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

35 - Conjugué 1 représenté par le composé P3.

Lot II : Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH₂

Lot T : Témoin = Acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque.

Solvant : le propylène glycol précédemment employé comme témoin dans l'exemple 6.

Une mesure de l'activité du témoin sera effectuée pour chaque expérimentation.

5

- Expérimentation et posologie

| | Lot I : Doses utilisées | Lot II : Doses utilisées |
|----|-----------------------------|-----------------------------|
| 10 | 1 = 0,1 μ g/souris/jour | 4 = 0,1 μ g/souris/jour |
| | 2 = 0,5 μ g/souris/jour | 5 = 0,5 μ g/souris/jour |
| | 3 = 2,5 μ g/souris/jour | 6 = 2,5 μ g/souris/jour |

Témoin : 10 ng d' acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque par souris et par jour.

15

Au cinquième jour, trente minutes après la dernière application toutes les souris sont sensibilisées avec 25 μ l de D N F B (2,4-dinitro-1-fluorobenzène (FLUKA CHEMIKA PURUM à 97 % lot N° 33820890)) à 2 % dans un mélange 4 pour 1 d'acétone (SDS réf. 05510) et de trioléine (FLUKA) appliqué par voie topique sur la région dorsale de peau rasée. Au sixième

20

jour, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de D N F B. Au onzième jour, l'épaisseur des oreilles des souris, est mesurée à l'aide d'un micromètre (ROCH 0 à 25 mm au 1/100 mm) afin d'obtenir des valeurs de base, puis les oreilles sont stimulées par application topique de 20 μ l de D N F B à 0,8 %. Au douzième jour, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des

25

lots qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot témoin. Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par la même équation que dans l'exemple 6.

30

Les résultats sont reportés dans le Tableau 5 ci-après.

TABLEAU 5

| 5 Lot | Dose* | % Augment. O. Gauche | % Augment. O. Droite | % Suppress. O. Gauche | % Suppress. O. Droite |
|----------|-------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| I | 2,5 | 11,00 | 11,40 | 80,28 | 79,64 |
| I | 0,5 | 13,00 | 12,90 | 76,70 | 76,96 |
| I | 0,1 | 15,60 | 14,60 | 72,04 | 73,92 |
| 10 T | 0,01 | 55,80 | 56,00 | - | - |
| II | 2,5 | 17,60 | 18,50 | 69,17 | 67,82 |
| II | 0,5 | 24,00 | 22,80 | 57,96 | 60,34 |
| II | 0,1 | 32,00 | 30,20 | 43,95 | 47,47 |
| T | 0,01 | 57,10 | 57,50 | - | - |

* µg/souris/jour.

15 On observe 80 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 2,5 µg/souris/jour pour le conjugué 1 (composé P3) selon l'invention, et une nette relation doses/effets entre les doses de 0,1, 0,5 et 2,5 µg/souris/jour. Par contre, pour le peptide seul, on observe 47 % de suppression de l'hypersensibilité cutanée à la dose de 0,1 µg/souris/jour et, pour les 20 doses de 0,5 µg et de 2,5 µg, la réponse suppressive est de l'ordre de 60 et 69 %. Enfin, on n'observe pas d'effet suppressif de l'hypersensibilité cutanée par administration de l'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque, en solution dans le propylène - glycol.

25 Administrés par voie topique et dans les conditions expérimentales décrites, le conjugué 1 selon l'invention induit de façon hautement significative la suppression de l'hypersensibilité cutanée chez la souris.

REVENDICATIONS

1 - Conjugué peptidique, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence peptidique comprenant au moins une séquence de 4 acides aminés dérivés de l' α MSH, les acides aminés étant sous forme naturelle ou non, ladite séquence étant conjuguée, chimiquement ou physiquement avec des acides sélectionnés parmi :

5 - les acides di-carboxyliques de formule générale I

$$\text{HOOC - R1 - COOH (I)}$$

10 dans laquelle R1 représente un radical alkylène, linéaire ou ramifié, comprenant au moins 3 atomes de carbone, de préférence de 3 à 10 atomes de carbone, éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino ou hydroxy, et

15 - les acides gras α -monoinsaturés de configuration cis ou trans, de préférence trans, de formule générale II

$$\text{R2 - CH = CH - COOH (II)}$$

dans laquelle R2 représente un radical alkyle, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence de 6 à 10 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo.

20 2 - Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide sélectionné sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

25 3 - Conjugué selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les acides de formules générales I où II sont de préférence choisis parmi les diacides carboxyliques de formule I pour lesquels R1 représente un reste alkylène en C₄-C₈, substitué ou non, en particulier les acides α -adipiques, α -amino-adipiques et dérivés, l'acide sébacique et dérivés, les acides gras α -monoinsaturés de formule II pour lesquels R2 représente un reste alkyle, linéaire ou ramifié en C₇, en particulier les acides hydroxydécenoïques, et décenoïliques, sous forme des sels, esters, ou amides correspondants.

30 4 - Conjugué selon la revendication 3, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide adipique, l'acide α -amino adipique, l'acide sébacique, l'acide trans - 10 - hydroxy - Δ^2 - décenoïque et l'acide trans-oxo - 9 - décéne - 2 - oïque.

35

5 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence peptidique comporte au moins l'une des séquences suivantes :

5 - Glu - His - Phé -
- His - Phé - Arg -
- Glu - His - Phé - Arg .

dans laquelle Phé représente la phénylalanine ou un dérivé halogéné de la phénylalanine notamment D-homo-Phé et parafluoro-Phé, les acides aminés pouvant être sous forme D, L, ou D,L

10 6 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il s'agit de conjugués de formule générale III :

A - X - Glu - His - Phé - Y (III)

dans laquelle

A est un acide de formules générales I ou II telles que définies dans les revendications 1, 3 et 4.

X représente un groupe 5-Me.Norleucine (Me.Nle), 2-N-Me.Norceuline (N-Me.Nle), OH ou NH₂.

Y représente un reste Arg - Z ou Z dans lequel Z est Trp - Gly - OH, Trp - OH, OH, Trp - Gly - NH₂, Trp - NH₂ ou NH₂.

20 Phé représente un reste D-Homo-Phé ou para-fluoro-Phé, les acides aminés étant sous forme D, L ou D,L.

7 - Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

| | | |
|----|----|--|
| 25 | 1 | A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH ₂ |
| | 2 | A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH ₂ |
| | 3 | A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH ₂ |
| | 4 | A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH ₂ |
| | 5 | A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - NH ₂ |
| | 6 | A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - NH ₂ |
| 30 | 7 | A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - NH ₂ |
| | 8 | A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - NH ₂ |
| | 9 | A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - NH ₂ |
| 10 | 10 | A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - NH ₂ |
| | 11 | A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - NH ₂ |
| 35 | 12 | A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - NH ₂ |
| | 13 | A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH |
| | 14 | A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH |

15. A - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - OH
16. A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
17. A - N - Me.Nle - Glu - His - D-homo-Phé - Arg - Trp - OH
18. A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
5 19. A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
20. A - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - OH
21. A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - Gly - OH
22. A - N - Me.Nle - Glu - His - para-fluoro-Phé - Arg - Trp - OH
A étant un acide de formules générales I ou II telles que définies dans les
10 revendications 1, 3 et 4, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de
sels d'esters ou d'amides.

8 - A titre de médicaments, les conjugués selon l'une des revendications 1 à 7.

9 - Médicament selon la revendication 8, utile pour le traitement
15 des allergies notamment cutanées, des réactions inflammatoires et des
troubles de la mélanogénèse, utilisable en médecine humaine et vétérinaire.

10 - Composition galénique, caractérisée en ce qu'elle comprend un
conjugué selon l'une des revendications 1 à 7.

11 - Composition galénique selon la revendication 10, caractérisée
20 en ce qu'il s'agit de préparations dermo-cosmétologiques sous forme de
solutions, de lotions d'émulsions, ou de crèmes utilisées comme accélérateur
de bronzage de la peau, sans exposition aux U.V.

12 - Composition galénique selon l'une des revendications 10 ou 11,
caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations galéniques, sous forme de
25 solutions, de lotions, de crème, de spray.

[0424]

TABLE 25

MARM analysis by Microneutralization Assay
RSV Microneutralization Assay On RSV A MARMs
to A4B4 with RSV Monoclonal Antibody.

| Antibody HC/LC | K272Q, N262K MARM to SYNAGIS® & A4B4 MARM 13 | Note |
|-------------------------|--|-------------|
| SYNAGIS®/SYNAGIS® | - | purified Ab |
| A4B4/A4B4 | - | purified Ab |
| A4B4/SYNAGIS® | - | purified Ab |
| SYNAGIS®/A4B4 | - | purified Ab |
| A4B4/L1FR | - | purified Ab |
| A4B4/L1FR S28R | - | purified Ab |
| A4B4/L1FR S28R, S52F | - | purified Ab |
| A4B4/L1FR-28R, S2F, 93F | - | purified Ab |
| A4B4/A4B428S | - | purified Ab |
| A4B4/A4B452S | - | purified Ab |
| Mab 13/19 | + | purified Ab |

+ = neutralization detected;
- = no neutralization detected

15. EXAMPLE

CLINICAL TRIALS

[0425] Antibodies of the invention or fragments thereof tested in in vitro assays and animal models may be further evaluated for safety, tolerance and pharmacokinetics in groups of normal healthy adult volunteers. The volunteers are administered intramuscularly, intravenously or by a pulmonary delivery system a single dose of 0.5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg or 15 mg/kg of an antibody or fragment thereof which immunospecifically binds to a RSV antigen. Each volunteer is monitored at least 24 hours prior to receiving the single dose of the antibody or fragment thereof and each volunteer will be monitored for at least 48 hours after receiving the dose at a clinical site. Then volunteers are monitored as outpatients on days 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, and 56 postdose.

[0426] Blood samples are collected via an indwelling catheter or direct venipuncture using 10 ml red-top Vacutainer tubes at the following intervals: (1) prior to administering the dose of the antibody or antibody fragment; (2) during the administration of the dose of the antibody or antibody fragment; (3) 5 minutes, 10 minutes, 15 minutes,

20 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 8 hours, 12 hours, 24 hours, and 48 hours after administering the dose of the antibody or antibody fragment; and (4) 3 days, 7 days 14 days, 21 days, 28 days, 35 days, 42 days, 49 days, and 56 days after administering the dose of the antibody or antibody fragment. Samples are allowed to clot at room temperature and serum will be collected after centrifugation.

[0427] The antibody or antibody fragment is partially purified from the serum samples and the amount of antibody or antibody fragment in the samples will be quantitated by ELISA. Briefly, the ELISA consists of coating microtiter plates overnight at 4°C. with an antibody that recognizes the antibody or antibody fragment administered to the volunteer. The plates are then blocked for approximately 30 minutes at room temperature with PBS-Tween-0.5% BSA. Standard curves are constructed using purified antibody or antibody fragment, not administered to a volunteer. Samples are diluted in PBS-Tween-BSA. The samples and standards are incubated for approximately 1 hour at room temperature. Next, the bound antibody is treated with a labeled antibody (e.g., horseradish peroxidase conjugated goat-anti-human IgG) for approximately 1 hour at room temperature. Binding of the labeled antibody is detected, e.g., by a spectrophotometer.

[0428] The concentration of antibody or antibody fragment levels in the serum of volunteers are corrected by subtracting the predose serum level (background level) from the serum levels at each collection interval after administration of the dose. For each volunteer the pharmacokinetic parameters are computed according to the model-independent approach (Gibaldi et al., eds., 1982, Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, New York) from the corrected serum antibody or antibody fragment concentrations.

[0429] Equivalents

[0430] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

[0431] All publications, patents and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference into the specification to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated herein by reference.

SEQUENCE LISTING

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 259

<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 1

Thr Ser Gly Met Ser Val Gly
1 5

-continued

<210> SEQ ID NO 2
<211> LENGTH: 16
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 2

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO 3
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 3

Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> SEQ ID NO 4
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 4

Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> SEQ ID NO 5
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 5

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> SEQ ID NO 6
<211> LENGTH: 9
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 6

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> SEQ ID NO 7
<211> LENGTH: 120
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 7

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

-continued

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO 8

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<221> NAME/KEY: misc_feature

<223> OTHER INFORMATION: VL Domain

<400> SEQUENCE: 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> SEQ ID NO 9

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<221> NAME/KEY: misc_feature

<223> OTHER INFORMATION: VH Domain

<400> SEQUENCE: 9

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

-continued

<210> SEQ ID NO 10
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 10

Thr Ala Gly Met Ser Val Gly
1 5

<210> SEQ ID NO 11
<211> LENGTH: 106
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 12
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 12

Ser Met Ile Thr Asn Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> SEQ ID NO 13
<211> LENGTH: 106
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 13

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr

-continued

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 14
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 14

Ser Ala Ser Ser Ser Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> SEQ ID NO 15
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 15

Asp Thr Phe Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> SEQ ID NO 16
<211> LENGTH: 9
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 16

Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> SEQ ID NO 17
<211> LENGTH: 120
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 17

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO 18
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

-continued

<400> SEQUENCE: 18

Thr Pro Gly Met Ser Val Gly
1 5

<210> SEQ ID NO 19
<211> LENGTH: 16
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 19

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO 20
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 20

Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> SEQ ID NO 21
<211> LENGTH: 106
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: misc_feature
<223> OTHER INFORMATION: VL Domain

<400> SEQUENCE: 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 22
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 22

Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> SEQ ID NO 23
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens

-continued

<400> SEQUENCE: 23

Asp Thr Phe Tyr Leu Ser Ser
1 5

<210> SEQ ID NO 24
<211> LENGTH: 120
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: misc_feature
<223> OTHER INFORMATION: VH Domain

<400> SEQUENCE: 24

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO 25

<211> LENGTH: 16

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 25

Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO 26

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

-continued

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 27
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<400> SEQUENCE: 27

Asp Thr Arg Gly Leu Pro Ser
1 5

<210> SEQ ID NO 28
<211> LENGTH: 120
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<400> SEQUENCE: 28

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO 29
<211> LENGTH: 10
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<400> SEQUENCE: 29

Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> SEQ ID NO 30
<211> LENGTH: 106
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<400> SEQUENCE: 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Met Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

-continued

| | | |
|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 |
|----|----|----|

| | | | | |
|---|----|----|----|----|
| Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp | 65 | 70 | 75 | 80 |
|---|----|----|----|----|

| | | | |
|---|----|----|----|
| Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr | 85 | 90 | 95 |
|---|----|----|----|

| | | |
|---|-----|-----|
| Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | 100 | 105 |
|---|-----|-----|

<210> SEQ ID NO 31

<211> LENGTH: 10

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 31

| | | | |
|---|---|---|----|
| Ser Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His | 1 | 5 | 10 |
|---|---|---|----|

<210> SEQ ID NO 32

<211> LENGTH: 7

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 32

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| Asp Thr Met Arg Leu Ala Ser | 1 | 5 |
|-----------------------------|---|---|

<210> SEQ ID NO 33

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 33

| | | | | |
|---|---|---|----|----|
| Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln | 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|---|----|----|

| | | | |
|---|----|----|----|
| Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Pro | 20 | 25 | 30 |
|---|----|----|----|

| | | | |
|---|----|----|----|
| Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu | 35 | 40 | 45 |
|---|----|----|----|

| | | | |
|---|----|----|----|
| Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser | 50 | 55 | 60 |
|---|----|----|----|

| | | | | |
|---|----|----|----|----|
| Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val | 65 | 70 | 75 | 80 |
|---|----|----|----|----|

| | | | |
|---|----|----|----|
| Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr | 85 | 90 | 95 |
|---|----|----|----|

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln | 100 | 105 | 110 |
|---|-----|-----|-----|

| | | |
|---------------------------------|-----|-----|
| Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | 115 | 120 |
|---------------------------------|-----|-----|

<210> SEQ ID NO 34

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 34

| | | | | |
|---|---|---|----|----|
| Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly | 1 | 5 | 10 | 15 |
|---|---|---|----|----|

-continued

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> SEQ ID NO 35

<211> LENGTH: 7

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 35

Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser
 1 5

<210> SEQ ID NO 36

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 36

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO 37

<211> LENGTH: 16

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 37

Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO 38

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

-continued

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 38

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Phe Lys Leu Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 39

<211> LENGTH: 10

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 39

Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> SEQ ID NO 40

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 40

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> SEQ ID NO 41

<211> LENGTH: 16

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 41

-continued

Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO 42
 <211> LENGTH: 106
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Leu Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> SEQ ID NO 43
 <211> LENGTH: 7
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 43

Asp Thr Met Tyr Gln Ser Ser
 1 5

<210> SEQ ID NO 44
 <211> LENGTH: 120
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 44

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Gly Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

-continued

<210> SEQ ID NO 45

<211> LENGTH: 16

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 45

Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO 46

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 46

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Met Tyr Gln Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Phe Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 47

<211> LENGTH: 10

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 47

Leu Pro Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met His
1 5 10

<210> SEQ ID NO 48

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 48

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys His Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

-continued

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Phe Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> SEQ ID NO 49

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Arg Val Gly Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> SEQ ID NO 50

<211> LENGTH: 7

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 50

Asp Thr Phe Phe Leu Asp Ser
 1 5

<210> SEQ ID NO 51

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<400> SEQUENCE: 51

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ala
 20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Met Ile Phe Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser